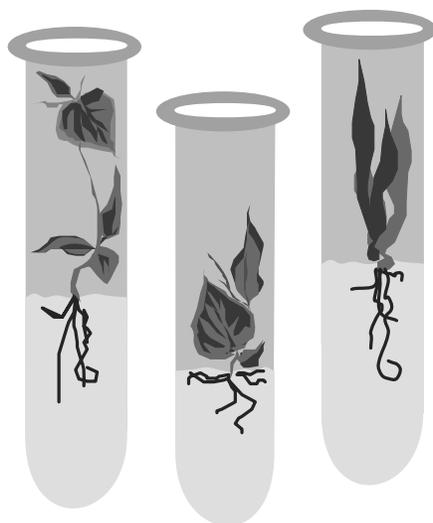


# 3

## Conservação Ex Situ de Recursos Genéticos



*Solange Carvalho Barrios Roveri José*

*Flavia França Teixeira*

*Antonieta Nassif Salomão*

*Paulo Ricardo Dias de Oliveira*

*Hymerson Costa Azevedo*

*Izulmé Rita Imaculada Santos*

*Osmar Alves Lameira*

*Alexandre Floriani Ramos*

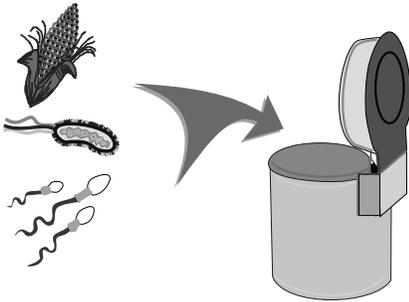
*Jerri Edson Zilli*

*Luis Henrique de Barros Soares*

*Daniela Lopes Leite*

*Ana Cristina Mazzocato*

## 90 O que é conservação ex situ?



É uma estratégia de conservação de componentes da biodiversidade ou de recursos genéticos animal, vegetal e microbiano fora de seu habitat natural, ou seja, sua manutenção é realizada em condições artificiais na forma de bancos de germoplasma vegetal, banco de germoplasma animal e coleções de microrganismos.

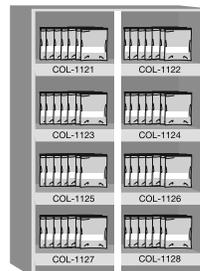
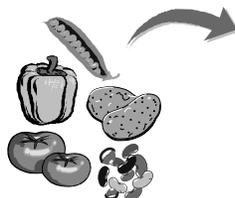
## 91 Por que fazer a conservação ex situ?

A conservação ex situ é uma alternativa para diminuir a perda contínua de recursos genéticos em razão de pressões de seleção naturais e artificiais. Considerando as múltiplas pressões sobre o meio ambiente, a destruição e fragmentação de habitats, bem como os possíveis impactos das mudanças climáticas sobre os recursos genéticos, a conservação ex situ torna-se uma estratégia importante de conservação, uma vez que resgata, conserva e disponibiliza o germoplasma para uso futuro, em ações de recuperação de habitats, reintroduções de espécies e em programas de melhoramento genético. Existe uma crescente conscientização mundial acerca da necessidade de preservação dos recursos genéticos, que são essenciais para o atendimento das demandas de variabilidade genética dos programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para a alimentação. No Brasil, essa necessidade é ainda mais importante, uma vez que a maioria dos cultivos que compõem a base alimentar do País é de origem exótica. Além disso, o agronegócio é um dos pilares da economia brasileira, e as bases que sustentam esse pilar são os chamados recursos genéticos. Portanto, a manutenção e o enriquecimento contínuos da variabilidade genética das coleções são prioritários e estratégicos.

92

## Qual a importância que a Embrapa tem dado à conservação *ex situ* de recursos genéticos?

A Embrapa tem dado grande importância à conservação dos recursos genéticos, o que pode ser visto pela sucessão de programas de pesquisa já criados, bem como pela grande quantidade de bancos de germoplasma estabelecidos.



Atualmente, a Embrapa conta com 148 bancos de germoplasma vegetal em 28 Unidades Descentralizadas, 1 banco de germoplasma animal e 25 coleções de microrganismos distribuídos em 17 Unidades Descentralizadas. Outra iniciativa importante da Embrapa na conservação *ex situ* foi a criação do banco genético (BGen), que reúne, em uma única estrutura, coleções de base de germoplasma animal e vegetal ou coleções *back-up* de microrganismos da Embrapa e de instituições parceiras. Na área de microrganismos, a Embrapa também tem atuação importante na organização dos centros de recursos biológicos (CRBs) na temática do Agronegócio.

93

## Qual é a diferença entre conservação *ex situ* e *in situ*? Essas modalidades de conservação são complementares?

A conservação *ex situ* significa a conservação dos componentes da diversidade biológica fora de seus habitats naturais, enquanto a conservação *in situ* significa a conservação dos ecossistemas e habitats naturais e a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seus ambientes naturais e, no caso de espécies domesticadas ou cultivadas, nos ambientes onde elas se adaptaram. Nenhuma estratégia sozinha pode responder pela adequada conservação, e, como ambas são complementares, devem ser utilizadas em conjunto para o sucesso da conservação (Nass, 2007).

## Quais são as vantagens e desvantagens da conservação ex situ?

As vantagens são (Brasil, 2017):

- Custos para a conservação ex situ menores e centralizados quando comparados com a conservação in situ, permitindo um manejo mais eficiente da coleção.
- Possibilidade de preservação de genes por séculos e de agrupar material genético de muitas procedências em um só local.
- Facilidade de obtenção de acessos pelo melhorista e possibilidade de intercâmbio de germoplasma.
- Melhor proteção à diversidade intraespecífica, especialmente de espécies de ampla distribuição geográfica.
- Maior segurança do germoplasma quanto a desastres naturais e conservação de material genético resgatado de áreas sob impacto antrópico.

As desvantagens são:

- Certos tipos de germoplasma não prontamente utilizáveis.
- Regeneração laboriosa e com custos elevados.
- Muitas coleções pouco documentadas, organizadas e caracterizadas.
- Interrupção do processo evolutivo da espécie caso não sejam realizadas coletas periódicas (Brasil, 2017).

## A manutenção de coleções ex situ é suficiente para garantir a conservação da variabilidade genética de uma determinada espécie?

Em teoria sim, mas na prática é um objetivo que demanda várias ações coordenadas ao longo do tempo. As coleções ex situ têm um papel muito importante para conservar as principais espécies para alimentação e agricultura, bem como espécies ameaçadas de extinção. Porém, é reconhecido que a conservação in situ também

tem grande importância para conservação da variabilidade genética, visto que pode conservar um número muito maior de espécies e mantém constantes os processos evolutivos.

96

**As coleções de germoplasma podem servir para identificar novos alimentos?**

Germoplasma proveniente de uma coleção pode mostrar, de forma preliminar, potencial para uso alimentar em uma determinada região, ou seja, as informações associadas ao acesso servem somente como indicação preliminar de adaptação local. Para que seja gerada uma indicação mais definitiva, é necessário que seja feito um tipo específico de avaliação experimental, contemplando as espécies de interesse, de modo que, posteriormente, possa ser gerada uma recomendação de uso fundamentada.

97

**Plantas mantidas ex situ que foram propagadas clonalmente e trazidas de sua região de origem são iguais às plantas originais?**

Sim, elas são iguais do ponto de vista da composição genética. Todavia, elas podem ter o comportamento alterado (diferente do observado na região de origem), por ação das condições ambientais a que estão submetidas ao longo do seu desenvolvimento.

98

**Uma espécie de planta pode desenvolver-se melhor ex situ do que em sua região de origem?**

Sim. Embora uma determinada espécie vegetal normalmente tenha desenvolvimento satisfatório em sua região de origem, que é decorrente do próprio processo evolutivo, pode ocorrer de essa espécie ter um desenvolvimento melhor em um ambiente exótico, em razão de não estar presente, por exemplo, nesse local, um

determinado fator abiótico ou biótico, que atua restringindo o seu desenvolvimento na região de origem.

99

### **O que é necessário para depositar acessos em uma coleção de germoplasma vegetal?**

Em primeiro lugar, é necessário verificar a adequação desse material biológico ao escopo do acervo e sua capacidade operacional. Dependendo do germoplasma, as amostras devem ser homogêneas, aparentemente sadias e representativas da diversidade da espécie, estirpe ou linhagem a ser depositada, e estar bem documentada para ingressar no sistema de conservação. Essa qualidade e pureza são verificadas em uma análise prévia, que vai confirmar ou não a solicitação de depósito podendo, em certos casos, ser rejeitada. O estabelecimento de prioridades para depósito de germoplasma é uma decisão estratégica dos gestores das coleções, e pode ser baseado em seu valor, ameaça de extinção, ou espécies importantes para a alimentação e agricultura, ou quando uma coleção tem baixa diversidade ou possui táxons de interesse insuficientemente representados. Informações a respeito de intercâmbio podem ser obtidas no Capítulo 7.

100

### **Qual é a infraestrutura necessária para a conservação ex situ de recursos genéticos?**

Em todas as coleções de germoplasma, é necessária uma infraestrutura básica para recepção, conferência e armazenamento das amostras, além de suporte administrativo e gerencial. É importante, também, dispor de uma área para triagem e processamento do material biológico/germoplasma, bem como um laboratório para manipulação e realização de análises de viabilidade e qualidade do material. Logo, para conservação ex situ, cada coleção necessita de equipamentos e infraestrutura específica condizentes com a natureza do germoplasma a ser conservado, foco principal de uma

coleção e/ou banco. Consideram-se infraestruturas necessárias para a conservação *ex situ* em cada área específica de recursos genéticos:

- Vegetal: câmaras climatizadas, casa de vegetação, telados, criotanques, freezer, além de estruturas de apoio, como laboratórios, cabines de fluxo laminar, câmara de secagem e galpão.
- Animal: criotanques e ultrafreezer  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para os casos que necessitem de avaliação do material conservado, é necessário contar com uma estrutura de laboratório contendo microscópio, estereomicroscópio e banho-maria.
- Microrganismos: refrigeradores, ultrafreezer ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), liofilizador, cabines de fluxo laminar dependendo do nível de segurança biológica requerido, tanques de nitrogênio, termociclador, área de preparo de meios de cultura, lavagem e esterilização, área para manipulação e processamento de material genético.

101

### Quais embalagens são utilizadas para acondicionar o germoplasma?

Diferentes tipos de embalagens são utilizados para acondicionar o germoplasma. Para a conservação de microrganismos, podem-se citar tubos de ensaio para estoques sob óleo, criotubos para congelamento e ultracongelamento, ampolas de vidro para liofilização, placas para repique contínuo. Tubos de ensaio de vidro são os mais comuns para a conservação *in vitro*. Para a criopreservação, são utilizados criotubos de material resistente à temperatura do nitrogênio líquido para embriões, meristemas, gemas apicais e laterais e sementes pequenas; e, para estruturas ou sementes maiores,



utilizam-se os envelopes aluminizados trifoliados, selados a quente (Santos; Salomão, 2010). Em bancos de sementes, também são utilizados frascos de vidro, latas de alumínio e recipientes de plástico, além de sacos de papel, dependendo do tipo de coleção. Para espécies animais, a conservação de sêmen e embriões é realizada em palhetas de polipropileno ou resina, ou em macrotubos. E, para a conservação de DNA e tecidos, são utilizados microtubos de até 2 mL (Ramos et al., 2012).

102

### **Quais exemplos de germoplasma vegetal, animal e de microrganismo são utilizados na conservação ex situ?**

- Vegetal: plantas, sementes, estacas, bulbos, pólen, óvulos, embriões, tecidos e células.
- Animal: embrião, sêmen (espermatozoide), ovócito, folículo pré-antral, célula somática e espermatogônia.
- Microrganismo: bactérias, vírus, fungos, leveduras, algas unicelulares e protozoários.

103

### **O DNA pode ser considerado germoplasma?**

Não, uma vez que não é possível recuperar um organismo multicelular somente a partir do DNA (ácido desoxirribonucleico). Entretanto, o DNA é um material biológico importante, pois, a partir dele, é possível gerar informações necessárias para a seleção de acessos/indivíduos a serem conservados e para orientar as estratégias de conservação e de melhoramento genético. Por essa razão, os bancos de DNA e de tecidos também podem ser considerados como parte da conservação ex situ.

104

### **Quais amostras biológicas podem ser utilizadas para extração de DNA de animais?**

Cada espécie animal tem uma fonte biológica preferencial, especialmente em virtude da facilidade na sua coleta. Os materiais

biológicos mais comuns para extração de DNA de animais vertebrados são o sangue, pelo com bulbo capilar, fragmentos de pele ou barbatanas e saliva. Em invertebrados, em geral, utiliza-se o animal inteiro.

105

### **Qual é a diferença entre banco de germoplasma e banco ativo de germoplasma?**

Banco de germoplasma é o local onde são mantidas coleções de indivíduos, populações, partes reprodutivas ou vegetativas em plantas, visando à preservação da variabilidade genética em uma espécie e em espécies relacionadas. É um termo genérico, geralmente relacionado à conservação vegetal, mas que se refere a organismos vivos em geral. O banco de germoplasma é denominado ativo quando contém indivíduos fisiologicamente funcionais e ativos, mantidos viáveis. Percebe-se que a nomenclatura “ativo” é muito utilizada no Brasil e possui a sigla BAG. Em inglês, utiliza-se somente *gene bank* ou *germplasm bank*. No caso animal, o banco ativo de germoplasma é chamado de núcleo de conservação. E, no caso de microrganismos, geralmente utiliza-se o termo coleção de culturas correlativo ao banco de germoplasma, que abriga microrganismos ou não.

106

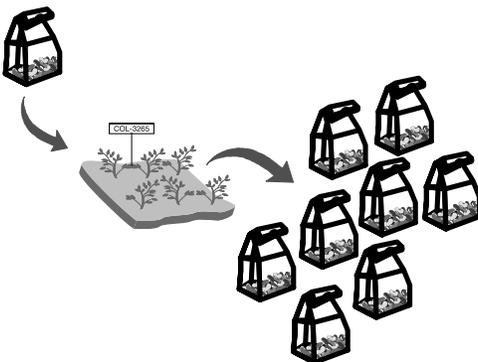
### **Quais são as atividades de rotina de um banco ativo de germoplasma, de um núcleo de conservação e de uma coleção biológica de microrganismo?**

- Introdução: é o enriquecimento das coleções por meio da coleta e/ou intercâmbio de amostras com outras instituições (Teixeira et al., 2005).
- Intercâmbio: é a troca de materiais entre instituições do mesmo país ou países diferentes de acordo com as legislações vigentes (Teixeira et al., 2005).

- **Monitoração:** é a verificação regular da qualidade e quantidade de acessos de germoplasma armazenado em um banco, na área vegetal (José, 2010). No caso de microrganismos, a rotina de avaliação das culturas inclui testes de viabilidade e vigor dos microrganismos, bem como a observação das características fenotípicas, após a reativação em meios apropriados.
- **Regeneração/multiplicação:** exclusiva para a área vegetal, é a recuperação de acessos que apresentam baixa viabilidade e/ou baixa quantidade de material, respectivamente (Teixeira et al., 2005).
- **Caracterização e avaliação dos acessos:** é a ampliação do conhecimento a respeito da coleção. A caracterização visa descrever o acesso por meio de descritores de fácil mensuração. Já a avaliação enfoca caracteres mais complexos, relacionados ao desempenho e que muitas vezes necessitam ser observados em diversas condições ambientais (Teixeira et al., 2005).
- **Documentação:** é o manejo das informações (dados) desde sua captação, digitalização, atualização e disponibilização em “base de dados” (Teixeira et al., 2005).

107

**Qual é a diferença entre multiplicação e regeneração de sementes? Por que essas atividades são importantes na conservação ex situ?**



As duas atividades são muito similares, pois envolvem a obtenção de novas sementes e renovação do estoque conservado. Quando o percentual de germinação das sementes de um acesso está abaixo de um dado limite, ou seja, a qualidade é

insatisfatória, é necessário fazer a regeneração da cultura. Quando o acesso tem baixa quantidade de sementes em estoque, ele precisa ser multiplicado. Em grandes culturas, geralmente o percentual de germinação limite para que o acesso necessite ser regenerado é de 85%, e a multiplicação é necessária quando a quantidade de sementes é inferior a 2 kg. Entretanto esses limites poderão variar de espécie para espécie. É possível que alguns acessos tenham baixa quantidade de sementes em estoque e também baixo percentual de germinação ao mesmo tempo. Nesses casos, o acesso deve ser tratado como prioritário para a multiplicação/regeneração. Na sementeira dos acessos que necessitam de regeneração, é importante considerar que deverá ser utilizado maior número de sementes para se obter o número de plantas desejadas no lote de regeneração, uma vez que muitas sementes podem não germinar (Teixeira et al., 2005).

108

**A etapa de regeneração/multiplicação dos acessos é obrigatória nos bancos de germoplasma?**

Essa etapa não é obrigatória se o material puder ser conservado indefinidamente sem perda significativa de sua viabilidade ou quando é possível a obtenção de novo germoplasma por reamostragem a partir da população de origem, em uma espécie cuja existência não se encontre sob ameaça de extinção.

109

**Toda espécie ou variedade vegetal pode ter suas sementes multiplicadas em qualquer lugar?**

Sim, mas é comum que espécies vegetais não se desenvolvam ou tenham seu desenvolvimento afetado quando cultivadas em outros locais diferentes dos seus locais de origem, o que pode levar a baixa produção de sementes. A maioria das espécies ou variedades vegetais é sensível às variações ambientais, tais como clima e solo. Essa adversidade pode ser contornada por meio da multiplicação de

plantas em ambientes similares aos locais de origem ou mesmo em casas de vegetação climatizadas.

110

### **Quais são os tipos de coleções utilizadas na conservação ex situ?**

Os tipos de coleções utilizadas em conservação ex situ para recursos genéticos vegetais são: coleção de base (Colbase), coleção ativa (Colativa), coleção nuclear (*Core collection*), coleção de trabalho, coleção in vivo (a campo), coleção in vitro, criopreservação e coleção genômica (Lopes et al., 2011).

Para recursos genéticos animais: coleção in vitro, quando o germoplasma é criopreservado (banco de germoplasma animal); e coleção in vivo, quando os animais são mantidos fora do ambiente natural ou em que está adaptado (FAO, 2012).

Para os microrganismos, são utilizadas as coleções de culturas, que podem ser classificadas como coleções de trabalho, coleções institucionais ou centros de recursos biológicos (CRB).

111

### **Quais tipos de microrganismos são encontrados nas coleções e sua importância?**

Microrganismos de interesse ao agronegócio, tais como agentes microbianos no controle biológico de pragas e doenças, bactérias fixadoras de nitrogênio, fungos micorrízicos, microrganismos biodegradadores e remediadores ambientais, microrganismos de interesse para agroindústria, assim como os patógenos de plantas e animais (Diniz, 2017).

112

### **Qual é o objetivo de estabelecer uma coleção nuclear?**

Representar, em um conjunto reduzido de acessos, a variabilidade genética de uma espécie, com um mínimo de redundância. O objetivo de estabelecer uma coleção nuclear é concentrar as atividades de caracterização e avaliação em um número menor

de acessos que representem a variabilidade do banco de germoplasma. Dessa forma, é possível formar uma base de informação mais completa acerca dos acessos que compõem a coleção nuclear e, assim, favorecer a ampliação do uso do banco de germoplasma.

### 113 A coleção nuclear substitui o banco de germoplasma?

Não, a coleção nuclear é um conjunto com menor número de acessos que representam a variabilidade da espécie, mas não substitui os bancos de germoplasma.

### 114 Quais são as diferenças entre banco ativo de germoplasma (BAG) e coleção elite?

No banco ativo de germoplasma, são preservados recursos genéticos de uma dada cultura/raça. A coleção elite é formada por recursos genéticos empregados em programas de melhoramento. A Tabela 1 lista alguns aspectos que diferenciam essas coleções no âmbito vegetal.

**Tabela 1.** Diferenças entre banco ativo de germoplasma e coleção elite.

| <b>Parâmetro</b>                   | <b>Banco ativo de germoplasma</b>   | <b>Coleção elite</b>   |
|------------------------------------|---|--|
| <b>Cruzamento entre indivíduos</b> | Não, pois o objetivo é manter a variabilidade dos acessos                         | Sim, pois o objetivo é criar e selecionar indivíduos de alto desempenho            |
| <b>Seleção fenotípica</b>          | Não, pois o objetivo é manter a variabilidade dos acessos                         | Sim, pois o objetivo é criar e selecionar indivíduos de alto desempenho            |
| <b>Manutenção de genótipos</b>     | Sim, as populações são mantidas em quantidades estabelecidas por tempo indefinido | Sim, porém pode haver descarte de genótipos que não tenham caracteres de interesse |
| <b>Intercâmbio</b>                 | Sim, de acordo com a disponibilidade de sementes e com a legislação vigente       | Sim, considerando os direitos da instituição e a legislação vigente                |

115

**Em recursos genéticos vegetais, quando a conservação in vitro deve ser utilizada e quais são as vantagens sobre a conservação em campo?**

A conservação in vitro é aplicável para as espécies de propagação vegetativa, com alta heterozigiosidade ou que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias. Entre as vantagens da conservação in vitro, destacam-se: redução do risco de perda por desastres climáticos e ataques de pragas e doenças (Matsumoto et al., 2010).

116

**Em recursos genéticos vegetais, no que difere a coleção de base da coleção ativa?**

Os bancos de germoplasma podem abrigar as coleções base e coleções ativas (Rao et al., 2007; José, 2010), que se diferenciam quanto ao tempo de conservação e o fluxo de entrada e saída de material. Na conservação em longo prazo na forma de sementes, por exemplo, o armazenamento do germoplasma é realizado por um período prolongado, por várias décadas a um século ou mais, como acontece nas coleções de base, e a temperatura utilizada é abaixo de zero. O armazenamento em médio prazo, como realizado nas coleções ativas e de trabalho, supõem-se que haverá uma perda mínima do material durante aproximadamente 10 anos, e a temperatura de conservação é de 0 °C a 10 °C. As sementes mantidas no banco ativo de germoplasma têm um fluxo de entrada e saída mais intenso, pois são usadas preferencialmente para fornecer amostras para trabalhos de pesquisa, atender a pedidos de intercâmbio, regenerar amostras e geralmente são associadas a programas de melhoramento. A coleção de base é uma coleção de cópia, ou *backup* da coleção ativa, e não é utilizada como fonte rotineira de distribuição, apenas para regenerar coleções ativas.

117

**O que é criopreservação?**

Criopreservação é um processo em que células ou tecidos biológicos são conservados em temperaturas muito baixas,

geralmente à temperatura do nitrogênio líquido (-196 °C) ou em seu vapor (-150 °C) (González-Benito et al., 2004; Santos; Salomão, 2010).

### 118 Qual é a importância da criopreservação?

A criopreservação suspende o metabolismo celular e, por isso, é o único método de conservação capaz de assegurar a preservação da integridade biológica e da estabilidade genética de germoplasma animal, vegetal e de microrganismo por períodos de tempo extremamente longos, possivelmente por tempo indeterminado (González-Benito et al., 2004).

### 119 Quais espécies podem ser conservadas usando a criopreservação?

A criopreservação é indicada para a conservação em longo prazo de espécies de plantas de interesse atual ou potencial que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias, são propagadas vegetativamente, apresentam alta taxa de heterozigiosidade ou longo período juvenil. Em animais, podem ser criopreservados gametas das principais espécies de mamíferos, peixes e aves, respeitando-se as peculiaridades de cada espécie. Para microrganismos, a criopreservação é bastante adequada para a preservação desde procarionotos (bactérias de forma geral) quanto eucarionotos, como os fungos.



### 120 Quais são as técnicas de criopreservação disponíveis para os recursos genéticos?

As técnicas disponíveis são baseadas na desidratação controlada ou na vitrificação das células e tecidos, tendo sido desenvolvidas

para minimizar danos por desidratação excessiva (osmóticos) e formação de cristais de gelo pelo congelamento (físicos) e assegurar altas taxas de regeneração após a criopreservação. Para a criopreservação de estruturas vegetativas e reprodutivas vegetais, as técnicas são imersão direta em nitrogênio líquido; vitrificação; encapsulamento-vitrificação; vitrificação-encapsulamento-vitrificação; pré-cultivo; pré-cultivo-vitrificação; gota-vitrificação e lâmina-vitrificação (Reed, 2008; Santos; Salomão, 2010). Em animais, os principais métodos utilizados são a congelação convencional ou lenta e a congelação sem equilíbrio ou vitrificação. Em microrganismos, a criopreservação consiste em manter as células submersas em nitrogênio líquido, com o auxílio de substâncias para proteção celular, como o glicerol, que evitam a formação de cristais de gelo durante o congelamento.

121

### **Quais são as técnicas utilizadas para a conservação de microrganismos?**

Para a conservação em longo prazo, pode-se utilizar a liofilização, que consiste na dessecação do material congelado, sob vácuo, o congelamento a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ultrafreezer) e a criopreservação. Para a conservação em médio prazo, em geral até 2 anos, pode-se utilizar a preservação em óleo mineral ou o congelamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , neste caso com algum protetor celular. Para curtos períodos de tempo, como utilizada em coleções de trabalho, utilizam-se subcultivos contínuos em meios de cultura apropriados (Sola et al., 2012; Diniz, 2017).

122

### **Para recursos genéticos animais, qual o melhor germoplasma a ser conservado, o sêmen ou o embrião?**

A conservação de sêmen e embriões é complementar. Na maioria das vezes, as tecnologias relacionadas à conservação do sêmen levam vantagem àquelas relacionadas ao embrião, por serem mais simples e econômicas em seu processamento e em sua

utilização. Entretanto, quando comparado ao embrião, o sêmen tem menos impacto do ponto de vista de recuperação de uma determinada espécie ou raça já que os espermatozoides contidos no sêmen carregam apenas 50% dos genes do animal. Nesse caso, há a necessidade de se fazer um longo trabalho durante, pelo menos, quatro gerações para se recuperar uma espécie ou raça utilizando inseminação contínua absorvente. Todavia, o embrião pode carregar 100% dos genes de uma determinada espécie ou raça e, logo na primeira geração, é possível obter-se a sua recuperação.

### **123 Qual profissional está habilitado a comercializar e congelar sêmen e embriões para conservar em bancos de germoplasma?**

A congelação de sêmen, no Brasil, para uso doméstico pode ser feita por médico-veterinário capacitado, mas a comercialização de sêmen congelado só pode ser feita por empresas especializadas e credenciadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa). Desse modo, para formação de banco de germoplasma, é recomendado usar sêmen congelado por centrais de reprodução credenciadas pelo Mapa para que, quando esse material precisar ser utilizado, não haja restrição legal. A colheita e congelação de embriões para conservação em bancos de germoplasma podem ser feitas por profissionais habilitados, sem a necessidade de empresas especializadas.

### **124 O que é criorresistência de sêmen? Existem diferenças entre espécies?**

O sêmen de cada espécie tem um nível de sensibilidade à criopreservação, mais conhecido como criorresistência. A criorresistência do sêmen está muito relacionada à capacidade da membrana plasmática dos espermatozoides em reagir e se adaptar às alterações provocadas pelo processo de congelação, como mudanças de pH,

osmolaridade e, em especial, de temperatura. Em consequência do processo de criopreservação, muitos desses espermatozoides sofrem uma capacitação precoce, chamada de criocapacitação. A capacitação é um processo natural ao qual o espermatozoide da maioria das espécies de mamíferos deve passar durante sua trajetória no sistema genital feminino e que o torna apto à fertilização. Esse processo não deve acontecer de forma precoce, pois, quando acontece, determina o tempo de vida restante dos espermatozoides e, portanto, deve acontecer somente próximo ao local e ao momento da ovulação. Espécies como a suína, ovina e equina são as que possuem sêmen com maior sensibilidade à criopreservação e apresentam elevados níveis de criocapacitação. Outras espécies como a bovina e caprina são comparativamente mais resistentes.

125

### **Quais são os critérios para seleção de embriões a serem criopreservados?**

Os critérios para a seleção dos embriões a serem criopreservados são o estágio de desenvolvimento e a qualidade do embrião. Preferencialmente, os embriões são criopreservados no estágio de desenvolvimento entre mórula compacta e blastocisto expandido com qualidade I ou II (dentro da escala de I a IV), em que são observadas também a coloração e a uniformidade das células embrionárias.

126

### **Quais são os critérios adotados para a escolha do método de conservação ex situ de sementes?**

Os critérios adotados para a escolha do método de conservação são as características intrínsecas (fisiológicas, físicas, químicas, reprodutivas e ecológicas) das sementes. Considera-se, igualmente, a finalidade da conservação em curto, médio ou longo prazo, assim como a disponibilidade de infraestrutura, recursos financeiros e mão de obra.

Semente ortodoxa é tolerante à desidratação a teores de água muito baixos e ao congelamento em temperaturas ultrabaixas como  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Semente com esse comportamento fisiológico é conservada por longo prazo em banco convencional de germoplasma semente e em banco criogênico.

Semente intermediária tolera parcialmente a desidratação. Dependendo da espécie, a dessecação pode ser conduzida até valores aproximados de 10% de teor de água. Entretanto, semente com esse comportamento fisiológico para fins de conservação é sensível ao congelamento em temperaturas subzero. Sobrevive por período de tempo de até 1 ano sem perda de germinabilidade em baixas temperaturas ( $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). O melhor método para a conservação de semente com essas características é a criopreservação da semente inteira em nitrogênio líquido ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), resgatando-se seu eixo embrionário e regenerando-o *in vitro*, ou a conservação *in vitro* em condições de crescimento lento e a criopreservação de estruturas vegetativas da espécie.

Semente recalcitrante apresenta intolerância variável à desidratação e sensibilidade ao congelamento em temperaturas subzero. Sobrevive por períodos de tempo inferiores aos das sementes intermediárias em baixas temperaturas. O melhor método para a conservação de semente com essas características são as mesmas descritas para semente intermediária (Rao et al., 2007; Hay; Probert, 2013).

## **127 Qual é a importância da água na conservação das sementes?**

A longevidade das sementes está sujeita à ação conjunta de vários fatores externos, dentre as quais a umidade e a temperatura são as mais importantes. A umidade relativa é considerada a mais influente, por causa da sua relação direta com o grau de umidade das sementes. O grau de umidade da semente geralmente acima de 30% pode propiciar a germinação de sementes quiescentes. Entre 18% e 30%, pode ocorrer rápida deterioração, principalmente pela ação de microrganismos. Acima de 20%, a taxa

respiratória associada a pouca ventilação pode provocar o aquecimento e, conseqüentemente, a morte das sementes. Abaixo de 9% de umidade da semente, a atividade de insetos de armazenamento é diminuída; e, abaixo de 4% a 5%, o ataque de pragas e fungos de armazenamento praticamente não ocorre (Marcos-Filho, 2015). O controle da umidade das sementes no armazenamento é feito pelo ajuste da umidade relativa (UR%) do ambiente por diversos métodos. Se a refrigeração for usada como meio de diminuir a temperatura do ambiente, a desumidificação é crucial, principalmente se as sementes estão acondicionadas em embalagens que permitam troca de umidade com o ambiente.

128

### **Quais métodos de secagem devem ser utilizados para armazenamento das sementes?**

Os métodos escolhidos dependerão do equipamento disponível, número e tamanho das amostras a serem secas, condições climáticas locais, considerações de custo e do tipo de coleção/período de conservação. Os métodos mais comuns para a secagem das sementes são a utilização de um dessecante ou câmara de secagem. O importante é considerar que, após secagem, as sementes devem ser acondicionadas em embalagens e ambientes apropriados, de modo a não permitir a reabsorção de água.

129

### **Como fazer para conservar as sementes se as condições de refrigeração não forem adequadas?**

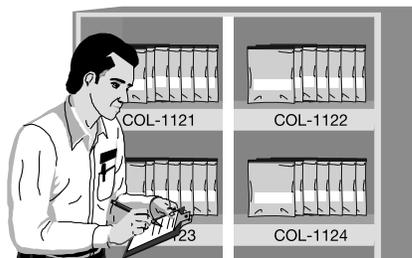
Se as condições de refrigeração não forem adequadas, pode-se reduzir o conteúdo de água das sementes, dependendo do seu comportamento fisiológico. O efeito da umidade durante o armazenamento não pode ser analisado independentemente da temperatura, mas, se houver opção, é preferível armazenar sob baixa umidade. Existe uma regra prática, segundo a qual o período para o armazenamento seguro duplica para cada redução de 1% no

teor de água das sementes ou decréscimo de 5,5 °C na temperatura ambiente (Marcos Filho, 2015). Essa regra deve ser utilizada para estimar o comportamento de sementes com graus de umidade entre 5% e 14% e temperatura entre 0 °C e 50 °C.

130

### Quais são as atividades do curador do banco de germoplasma?

O curador desenvolve uma série de atividades vinculadas à ampliação, à manutenção, à agregação de informação e ao uso da variabilidade genética mantidas no banco de germoplasma. Entre essas atividades se destacam (Nass, 2007):



- Inventariar a coleção de germoplasma.
- Zelar pela conservação da coleção.
- Manter informações sobre a disponibilidade do germoplasma.
- Realizar expedições de coleta.
- Multiplicar e/ou regenerar os acessos do banco de germoplasma.
- Descrever atributos dos acessos por meio dos descritores.
- Elaborar manual com a metodologia para emprego dos descritores.
- Elaborar catálogos com acessos do banco de germoplasma.
- Colaborar para a formação de profissionais que venham a atuar na área de conservação de recursos genéticos.
- Atender a solicitações de intercâmbio de amostras de acessos do banco de germoplasma.
- Manter informações relativas ao banco de germoplasma organizadas em bancos de dados.
- Manter-se atualizado sobre questões relativas à coleção mantida no banco de germoplasma.

- Participar da elaboração e acompanhar as legislações nacionais e internacionais referentes aos recursos genéticos.

131

**Qual é a implicação da forma de polinização (alogamia/autogamia) na multiplicação de recursos genéticos vegetais?**

Os acessos de espécies autógamas tendem a ser formados por indivíduos homocigóticos e idênticos ou muito próximos geneticamente entre si, portanto um ou poucos indivíduos representam o acesso. Já em plantas alógamas, um acesso é uma população composta de indivíduos com maior variabilidade genética entre si, e, para representar geneticamente um acesso, é necessário um número maior de indivíduos. Essa diferença na forma de polinização é muito importante na multiplicação e/ou regeneração de acessos de bancos de germoplasma, para definir o número de indivíduos que deverão ser incluídos no lote de multiplicação/regeneração e, com isso, garantir que o novo lote de sementes do acesso represente a variabilidade genética do lote anterior.

132

**É possível encontrar variação fenotípica entre indivíduos de um mesmo acesso mantido em um banco de germoplasma?**

Sim, é possível para os vegetais e microrganismos. Muitas espécies vegetais mantidas em banco de germoplasma são alógamas, ou seja, apresentam fecundação cruzada. Nesse caso, um acesso não é um indivíduo e, sim, uma população, ou seja, um conjunto de indivíduos. Entre esses indivíduos poderá haver variação genética para alguns caracteres, o que resultará em variação fenotípica. Nos microrganismos, pode haver variações nas características visíveis a partir da interação desses com ambiente ou hospedeiro específico. A variação fenotípica é mais comum em fungos. No caso de animais, o próprio animal é considerado o acesso, ou espécime.

133

### **Qual é a diferença entre semente botânica e semente agrônômica?**

O termo semente é usado para designar partes da planta com a capacidade de originar um novo indivíduo. Sob o ponto de vista da botânica, as sementes são formadas pela fecundação, ou seja, pela união de dois gametas, e, por essa razão, essa semente é denominada semente botânica. Muitas espécies são multiplicadas por meio de sementes botânicas, tais como milho, trigo, arroz, feijão, soja, algodão, e uma série de hortaliças, como tomate, pimentão, cenoura. Entretanto, algumas espécies, apesar de produzirem sementes botânicas, são usualmente reproduzidas por propágulos derivados de outras partes da planta e não pela semente botânica. Essa forma de multiplicação é denominada multiplicação ou propagação vegetativa. As lavouras das espécies propagadas vegetativamente são implantadas utilizando-se os propágulos que também são sementes e que, muitas vezes, são denominadas sementes agrônômicas justamente para diferenciar daquelas sementes obtidas por fecundação. Algumas espécies que têm suas lavouras implantadas em geral por sementes agrônômicas são batata, cana-de-açúcar, morango.

134

### **As sementes podem permanecer vivas durante centenas ou milhares de anos, em condições naturais?**

Em coleções mantidas em museus, como o de História Natural, em Paris, as longevidades relatadas variaram de 55 e 158 anos. No entanto, foi com uma semente de lótus (*Nelumbo nucifera*), procedente da China, com  $1.288 \pm 271$  anos, o registro como a mais antiga semente em que tanto a idade como a germinação foram documentadas de maneira científica.

135

### **Por quanto tempo podemos conservar o germoplasma animal *in vitro*?**

Apesar de a técnica de congelamento de germoplasma animal ter, aproximadamente, 60 anos, em teoria, o germoplasma pode ser

conservado por tempo indeterminado desde que imerso em nitrogênio líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

136

**Qual é o número ideal de doses de sêmen e de embriões a ser criopreservado para assegurar a conservação de uma raça?**

Quando se pensa em assegurar a conservação de uma raça baseada no germoplasma conservado em nitrogênio líquido, deve-se pensar na quantidade de palhetas de sêmen e de embriões congelados necessários para restaurar essa raça no caso de uma eventual extinção. A quantidade de sêmen varia conforme a espécie, o número de fêmeas que vão ser inseminadas e a taxa de fertilidade dessas fêmeas usando o sêmen conservado. Como exemplo, para ruminantes, são necessárias aproximadamente 50 doses de sêmen de 25 reprodutores, no total de 1.250 palhetas, para serem utilizadas em 250 fêmeas alcançando uma taxa de gestação de 40%. No caso de embriões, a quantidade necessária para reconstituir uma raça varia com a taxa de gestação e a taxa de desmama dos produtos nascidos. Seguindo com o exemplo dos ruminantes, são necessários aproximadamente 250 embriões oriundos de 25 fêmeas e 25 machos diferentes quando considerada uma taxa de gestação de 40% e taxa de desmama de 80%.

137

**Para cada tipo de germoplasma, quais as técnicas de conservação ex situ que podem ser adotadas e suas particularidades?**

Recurso genético animal (FAO, 2012):

- Conservação ex situ in vitro em que sêmen, embriões, ovócitos, células somáticas, folículos pré-antrais e espermatogônias são conservados por longo prazo em nitrogênio líquido ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

- Conservação ex situ in vivo em que animais vivos são criados fora de seu ambiente natural, como em jardim zoológico e piscicultura, ou fora do bioma em que estão adaptados.

Recurso genético vegetal:

- Sementes ortodoxas em banco convencional de germoplasma por longo ou médio prazo.
- Espécies propagadas vegetativamente, espécies com alta taxa de heterozigiosidade, espécies com sementes recalcitrantes, espécies com longo período juvenil, meristemas, ápices caulinares, conservadas por curto ou médio prazo em coleções in vitro.
- Sementes ortodoxas, intermediárias e recalcitrantes, ápice caulinares, células em suspensão, embriões somáticos e zigóticos, eixo embrionário, gemas axilares, meristemas, pólen, conservados por longo prazo em condições criogênicas (-196 °C) (González-Benito et al., 2004).
- Espécies perenes como fruteiras, madeireiras, medicinais, ornamentais, parentes silvestres e com sementes recalcitrantes geralmente conservadas em banco ativo de germoplasma (BAG) a campo. Dependendo da espécie, em curto, médio e longo prazo.
- Jardins botânicos (Brasil, 2017).

Recurso genético microbiano (Sola et al., 2012):

- Em meio de cultivo com repicagem contínua em curto prazo.
- Em óleo mineral e congelamento a -20 °C, em médio prazo.
- Em condições criogênicas, liofilizado e congelamento a -80 °C, em longo prazo (Mello et al., 2011).

## Referências

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Conservação in situ, ex situ e on farm**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-in-situ,-ex-situ-e-on-farm>>. Acesso em: 4 set. 2017.

DINIZ, F. Dos bancos genéticos para o mercado: Embrapa estuda funcionalidade de microrganismos. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/24759263/dos-bancos-geneticos-para-o-mercado-embrapa-estuda-funcionalidade-de-microrganismos>>. Acesso em 10 out. 2017.

FAO. **Cryoconservation of animal genetic resources**. Rome, 2012. (FAO Animal Production and Health Guidelines, 12).

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; CLAVERO-RAMÍREZ, I.; LÓPEZ-ARANDA, J. M. REVIEW. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. **Spanish Journal of Agricultural Research**, n. 2, p. 341-351, 2004.

HAY, F. R.; PROBERT, R. J. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. **Conservation Physiology**, v. 1, p. 11, 2013.

JOSÉ, S. C. B. R. **Manual de curadores de germoplasma - vegetal**: conservação *ex situ* (Colbase - Sementes). Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 12 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 317).

LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. da F.; FALEIRO, F. G.; FOLLE, S. M.; GUIMARÃES, E. P. (Ed.). **Pré-melhoramento de plantas**: estado da arte e experiências de sucesso. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. 614 p.

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina: Abrates, 2015. 660 p.

MATSUMOTO, K.; CARDOSO, L. D.; SANTOS, I. R. I. **Manual de curadores de germoplasma vegetal**: conservação *in vitro*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 11 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 318).

MELLO, S. C. M. de; REIS, A.; SILVA, J. B. T. da. **Manual de curadores de germoplasma - micro-organismos**: fungos filamentosos. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 25 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 335; Embrapa Hortaliças. Documentos, 134).

NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 858 p.

RAMOS, A. F.; AZEVEDO, H. C.; CASTRO, S. T. R.; EGITO, A. A. **Manual de curador de germoplasma – animal**: conservação *ex situ/in vitro* de sêmen, embriões, DNA e tecidos. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e

Biotecnologia, 2012. 18 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 340).

RAO, N. K.; HANSON, J.; DULLOO, M. E.; GLOSH, K.; NOWELL, D.; LARIND. M. **Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma**. Roma: Bioversity International, 2007. 164 p. (Manuales para Bancos de Germoplasma, 8).

REED, B. **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer-Verlag, 2008.

SANTOS, I. R. I; SALOMÃO, A. N. **Manual de curadores de germoplasma – vegetal: criopreservação**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 16 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 319).

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P. de; FEISTEL, J. C.; REZENDE C. S. M. E. **Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade** Enciclopédia biosfera, v. 8, n. 14, p. 1398-1418, jun. 2012.

TEIXEIRA, F. F.; SOUZA, B. O.; ANDRADE, R. V.; PADILHA, L. **Boas práticas na manutenção de germoplasma e variedades crioulas de milho**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. 8 p. (Comunicado técnico, 113).